



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Paula Pranjić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

MAKROLIDNI ANTIBIOTICI

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marko Močibob

Zagreb, 2019. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

16. srpnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

06. rujna 2019.

Mentor rada: doc. dr. dc. Marko Močibob

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Makrolidni antibiotici.....	1
1.1.1. Ribosomi i biosinteza proteina.....	2
§ 2. MAKROLIDI.....	4
2.1. Strukturna i kemijska svojstva makrolida	4
2.1.1. 14-erolančani makrolidni antibiotici	5
2.1.2. 15-erolančani makrolidni antibiotici	6
2.1.3. 16-erolančani makrolidni antibiotici	7
2.1.4. Ketolidi.....	8
2.2. Mehanizam djelovanja	9
2.2.1. Vezno mjesto za makrolide.....	9
2.2.2. Inhibicija sinteze proteina.....	11
2.3. Mehanizmi bakterijske rezistencije na makrolide	13
2.3.1. Smanjenje unutarstanične koncentracije makrolida.....	13
2.3.2. Modifikacije na ribosomu	14
2.3.3. Kemijske modifikacije makrolida.....	15
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XVIII

§ Sažetak

Makrolidni antibiotici predstavljaju veliku obitelj inhibitora sinteze proteina u bakterijskim stanicama. Sastoje se od makrocikličkog laktona različitih veličina prstena, na kojeg su vezane jedna do tri molekule šećera. Najčešći su 14-, 15- i 16-eročlani makrolidi. Kao prirodni ili polusintetski antibiotici djeluju tako što se selektivno vežu na 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma, pri čemu ometaju sintezu proteina inhibiranjem aktivnosti peptidil-transferaznog centra koji je odgovoran za stvaranje peptidne veze između aminokiselina. Visok afinitet makrolida prema bakterijskim ribosomima, zajedno s očuvanom strukturom ribosoma u gotovo svim bakterijama, u skladu je s njihovom širokom aktivnošću. Otkako je 1950-ih godina otkriven prvi klinički važan i glavni predstavnik makrolida, eritromicin, sintetizirani su i mnogi drugi derivati, što je dovelo do spojeva sa boljom biološkom raspoloživosti, stabilnošću u kiselim medijima te poboljšanim farmakološkim svojstvima. Visoka učinkovitost, sigurnost i upotreba makrolida kao alternativa za liječenje pacijenata intolerantnih na penicilin, učinila ih je često korištenim lijekovima što je dovelo do pojave otpornih bakterijskih vrsta. Mikroorganizmi su razvili nekoliko mehanizama otpornosti na makrolidne antibiotike. Primarni mehanizam rezistencije je mutacija jednog ili više nukleotida u veznom mjestu makrolida na ribosomu, ali su moguće i mutacije ribosomskih proteina kao i modifikacije samih makrolida. Pojava otpornosti i želja za spojevima boljih farmakoloških svojstava doveli su do razvijanja novih generacija makrolida poput polusintetskih 14-eročlanih makrolida (klaritromicin, roksitromicin i drugi), azitromicina i ketolida.

§ 1. UVOD

1.1. Makrolidni antibiotici

Makrolidni antibiotici sastoje se od makrocikličkog laktone različitih veličina na kojeg se vežu jedna ili više molekula šećera, najčešće deozamin i kladinoza. Također, laktonski prsten je još dodatno supstituiran alkilnim i hidroksilnim skupinama, te ponekad alkoksidnom, karbonilnom ili fluoridnom skupinom. Makrolidni antibiotici mogu se razlikovati prema veličini laktonskog prstena, pri čemu su najzastupljeniji 14-, 15- i 16-eročlani prstenovi.

Makrolidni antibiotici mogu se podijeliti u tri generacije. Prva generacija su prirodni spojevi koje sintetiziraju poliketidne sintaze prisutne u raznim vrstama bakterija iz roda *Streptomyces*. Prvi izolirani makrolid je bio pikromicin, a prvi izolirani i klinički korišteni makrolidni antibiotik je bio eritromicin. Iako postoje i drugi mikroorganizmi koji sintetiziraju ovu klasu spojeva, ne nalaze svi kliničku primjenu, odnosno nemaju odgovarajuća farmakološka svojstva. Jedno od bitnih svojstava je stabilnost makrolida u kiselim uvjetima, kako bi mogli imati oralnu primjenu. Pojava rezistencije, osjetljivost eritromicina u kiselim uvjetima, te želja za dobivanjem antibiotika boljih farmakoloških svojstava, doveli su do stvaranja druge generacije makrolidnih antibiotika. To su polusintetski spojevi, odnosno derivati eritromicina A. U osamdesetim je godinama 20. stoljeća sintetiziran klaritromicin, mnogo stabilniji antibiotik u kiselim uvjetima, a dobiven je metilacijom hidroksilne skupine na C-6 atomu laktonskog prstena eritromicina. Također, u to je vrijeme, u hrvatskoj tvornici lijekova PLIVA, razvijen azitromicin, 15-eročlani makrolidni antibiotik, karakteriziran metil-supstituiranim atomom dušika unutar laktonskog prstena. Osim povećane stabilnosti u kiselim uvjetima, azitromicin ima širok spektar djelovanja i poboljšana farmakološka svojstva. Sve veća pojava rezistencije bakterija na dotadašnje makrolide dovela je do razvoja treće generacije makrolidnih antibiotika, nazvanih ketolidima. Ketolidi se dobivaju kemijskim modifikacijama makrolidnih antibiotika dobivenih na bazi eritromicina, pri čemu je rezultat karbonilna skupina na C-3 atomu laktonskog prstena umjesto kladinoze.

Makrolidi inhibiraju sintezu proteina tako što se vežu na bakterijske ribosome, u izlazni tunel peptida. Ovisno o strukturi, makrolidi mogu djelovati kao bakteriostatski lijekovi, pri

čemu zaustavljaju rast bakterija ili kao bakteriocidni lijekovi koji bakterije ubijaju. Djeluju na većinu Gram-pozitivnih bakterija, a slabije na Gram-negativne bakterije.

Mikroorganizmi su razvili nekoliko mehanizama za stvaranje rezistencije na makrolidne antibiotike. Iako je glavni mehanizam modifikacija jednog ili više nukleotida u veznom mjestu makrolida na ribosomu, također su važne mutacije ribosomskih proteina, smanjenje unutarstanične koncentracije makrolida te kemijske modifikacije samih makrolidnih antibiotika. Modifikacije na ribosomu ili makrolidu uzrokuju neproduktivno vezanje tih makrolida na ribosom.

1.1.1. Ribosomi i biosinteza proteina

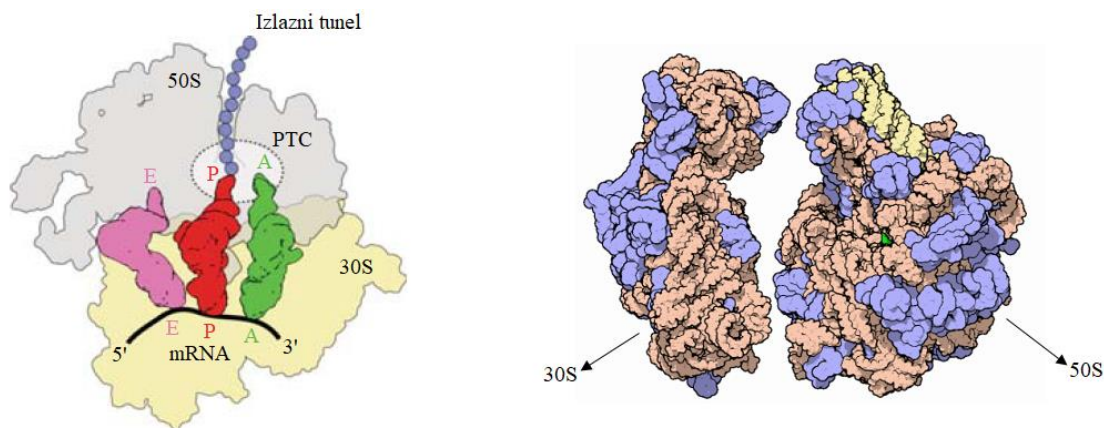
Ribosom je ribonukleoproteinski supramolekulski kompleks odgovoran za biosintezu proteina u stanicama, što ga čini jednom od najboljih meta za djelovanje antibiotika. Građen je od proteina i ribosomskih RNA molekula (rRNA). Bakterijski 70S ribosom (pri čemu je S sedimentacijski koeficijent), građen je od male podjedinice 30S i velike podjedinice 50S, dok se eukariotski ribosom 80S sastoji od podjedinica 40S i 60S. Osim po veličini, eukariotski i bakterijski ribosomi se razlikuju po broju ribosomskih proteina odnosno RNA molekula. Sažeti sastav ribosoma je prikazan u tablici 1. Selektivno vezanje makrolidnih antibiotika na bakterijske ribosome posljedica je prethodno navedenih razlika.

Tablica 1. Sastav ribosoma bakterijske i eukariotske stanice s obzirom na broj proteina i molekula rRNA. Preuzeto i prilagođeno iz S. Arenz, *et al.*, *Cold Spring Harbor Perspect. Med.*, **6** (2016) 2.

Bakterijski ribosom		Eukariotski ribosom	
70S	57 ribosomska proteina 3 rRNA molekula	80S	80 ribosomskih proteina 4 rRNA molekule
50S	36 ribosomska proteina 5S rRNA 23S rRNA	60S	47 ribosomska proteina 5S rRNA 28S rRNA 5,8S rRNA
30S	21 ribosomski protein 16S rRNA	40S	33 ribosomska proteina 18S rRNA

Mala podjedinica služi za dekodiranje genetske informacije koja je kodirana na mRNA, dok se u velikoj podjedinici odvija sama sinteza proteina, odnosno stvaranje peptidnih veza. Osim ribosoma i molekule mRNA, za sintezu proteina su potrebne i molekule tRNA, koje donose aktivirane aminokiseline u obliku aminoacil-tRNA i dekodiraju genetski kod pomoću antikodonske domene molekule tRNA. Ribosom sadrži tri vezna mjesta za tRNA (prikazani su na slici 1) – peptidilno (P) mjesto u kojem se nalazi molekula tRNA za koju je vezan rastući peptid, aminoacilno (A) mjesto gdje se veže dolazna molekula aminoacil-tRNA, te izlazno mjesto (E) u kojem se nalazi deacilirana molekula tRNA.¹

Mjesto u ribosomu odgovorno za katalizu stvaranja peptidne veze je peptidil-transferazni centar (PTC, od eng. peptidyl transferase center), smješten u velikoj podjedinici ribosoma. Aktivno mjesto peptidil-transferaznog centra je prvenstveno izgrađeno od 23S rRNA, stoga ona katalizira nastanak peptidne veze između aminokiselina, pa je ribosom zapravo ribozim. Nova peptidna veza nastaje uslijed nukleofilnog napada aminokiseline vezane za tRNA u A-mjestu na karbonilni ugljikov atom esterske veze, kojom su povezani nastajuć peptid i tRNA u P-mjestu. Sintetizirani protein napušta ribosom tako što se provlači kroz prazan tunel (NPET, od eng. nascent peptide exit tunnel), koji prolazi kroz veliku podjedinicu.



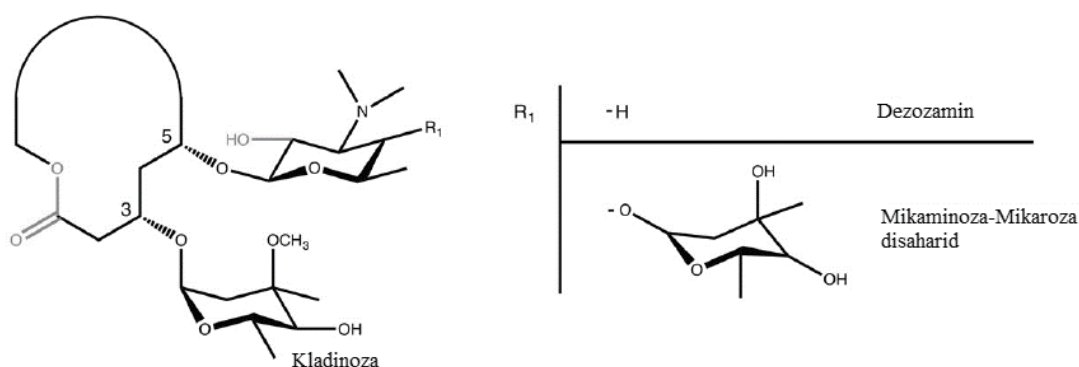
Slika 1. Shematski prikaz bakterijskog ribosoma na koji su vezane tri tRNA molekule (lijevo). (Preuzeto i prilagođeno iz S. Arenz, *et al.*, *Cold Spring Harbor Perspect. Med.*, **6** (2016) 2).

Desno je prikazana trodimenzionalna struktura bakterijskog ribosoma. Plavo su označeni ribosomski proteini, a crveno i žuto rRNA. (Preuzeto iz <https://pdb101.rcsb.org/motm/10>).

§ 2. MAKROLIDI

2.1. Strukturna i kemijska svojstva makrolida

Makrolidi se sastoje od makrocikličkog laktonskog prstena, prema kojem im je 1950-ih godina Woodward dodijelio to ime. Na makrocikličkom prstenu vezane su jedna do tri molekule šećera pomoću glikozidne veze, te najčešće hidroksilne i alkilne skupine. U većini makrolidnih antibiotika jedna je molekula šećera vezana na C-5 atom laktonskog prstena, pri čemu su to šećeri dezozamin ili mikaminoza. Ukoliko je na tom položaju vezana mikaminoza, na nju se veže mikaroza pri čemu nastaje disaharid (slika 2). Još jedan od često prisutnih šećera u makrolidima je kladinoza, koja se veže na C-3 atom laktonskog prstena.

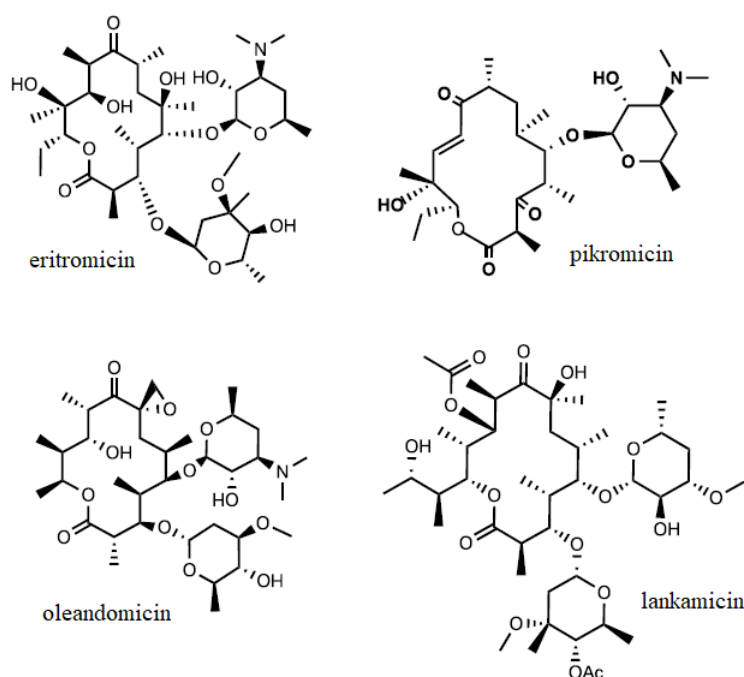


Slika 2. Vezanje šećera kladinoze, dezozamina te disaharida mikaminoza-mikaroza na makrociklički laktonski prsten. Preuzeto i prilagođeno iz T. Golkar, *et al.*, *Front. Microbiol.*, **9** (2018) 1942.

Osim po vezanoj molekuli šećera, makrolidi se razlikuju i prema veličini makrocikličkog laktonskog prstena. Ta veličina varira od 8-eročlanog sve do 62-očlanog prstena, ali medicinski važni makrolidi su oni koji se sastoje od 14-, 15- i 16-eročlanog laktonskog prstena.

2.1.1. 14-erolančani makrolidni antibiotici

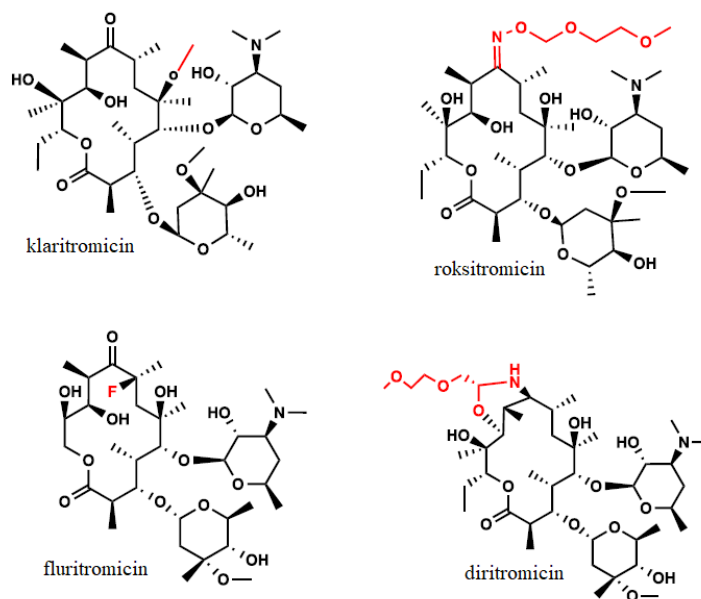
Glavni predstavnik ove skupine makrolida je eritromicin A, prvi prirodni makrolidni antibiotik koji je imao kliničku primjenu, a izoliran je iz bakterije *Streptomyces erythraeus* 1952. godine. Dvije su molekule šećera vezane za 14-eročlani prsten eritromicina A – kladinoza na C-3 atomu i dezozamin na C-5 atomu. Molekula eritromicina A ima ukupno deset kiralnih centara, što ju čini vrlo dobrom polaznom supstancom za sintezu makrolidnih antibiotika sa boljim farmakološkim svojstvima, osobito bolje stabilnosti u kiselom mediju. Naime, u želucu gdje je medij kiseo, eritromicin A se metabolizira do anhidrohemiketalnog i spiroketalnog derivata eritromicina A što uzrokuje gubitak antibakterijskog djelovanja i pojavu mučnine.² Osim eritromicina, poznati prirodni makrolidi ove skupine su oleandomicin, lankamicin i pikromicin. Oni su također nestabilni u kiselom mediju. Strukture ovih makrolida prikazane su na slici 3.



Slika 3. Strukturne formule prirodnih makrolida sa 14-eročlanim laktonskim prstenom – eritromicin, pikromicin, oleandomicin i lankamicin. Preuzeto i prilagođeno iz G. P. Dinos, *Br. J. Pharmacol.*, **174** (2017) 2968.

Osjetljivost eritromicina A i ostalih prirodnih makrolida na kiseli medij želuca rezultirala je pripremom druge generacije makrolida, odnosno polusintetskih derivata eritromicina A sa boljim farmakološkim svojstvima – bolja stabilnost u kiselom mediju, produljen biološki

poluživot i bolje prodiranje u tkiva. Od 14-eročlanih polusintetskih makrolida, pripremljeni su klaritromicin, roksitromicin, fluritrocimin i diritrocimin, a strukture su prikazane na slici 4. Svi navedeni derivati eritromicina sadrže modifikacije na atomima C-6 i C-9, što sprječava stvaranje hemiketalnih i spiroketalnih oblika u kiselom mediju. Iako se klaritromicin razgrađuje u kiselom mediju, brzina te reakcije je puno niža u odnosu na razgradnju eritromicina.



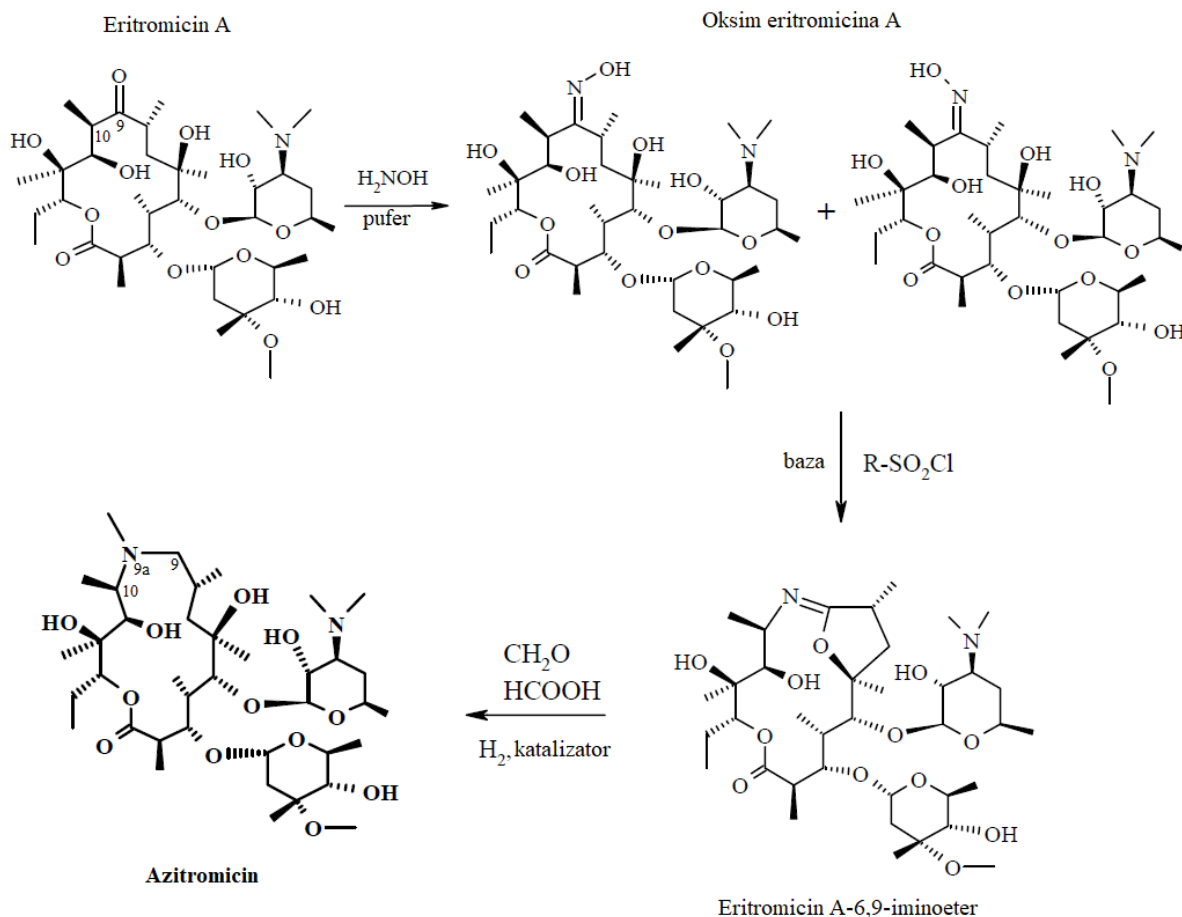
Slika 4. Strukturne formule druge generacije 14-eročlanih makrolida. Crvenom bojom su označene umetnute modifikacije na molekulu eritromicina. Preuzeto i prilagođeno iz G. P.

Dinos, *Br. J. Pharmacol.*, **174** (2017) 2968.

2.1.2. 15-erolančani makrolidni antibiotici

Prvi i glavni predstavnik skupine makrolida sa 15-eročlanim prstenom je azitromicin, koji pripada azalidima (klasa makrolidnih antibiotika sa dušikovim atomom u laktonskom prstenu). Azitromicin je dakle karakteriziran metil-supstituiranim dušikovim atomom na položaju 9a unutar laktonskog prstena (slika 5). Sintetiziran je 1980. godine od strane hrvatskog tima znanstvenika u tvornici lijekova PLIVA. Azitromicin je dobiven Beckmannovom pregradnjom oksima eritromicina A, koji nastaje iz eritromicina pomoću hidroksilamin hidroklorida u prisutnosti slabe baze i pufera. Tretiranjem oksima eritromicina A sa aromatskim sulfokloridom nastaje odgovarajući iminoeter, čijom reduktivnom metilacijom u konačnici nastaje azitromicin. Shematski je prikaz sinteze azitromicina prikazan na slici 5. Azitromicin

karakterizira širok spektar djelovanja, stabilnost u kiselom mediju, jače djelovanje u odnosu na eritromicin te brzo prodiranje u tkiva, što ga čini jednim od najuspješnijih antibiotika na svjetskoj razini.

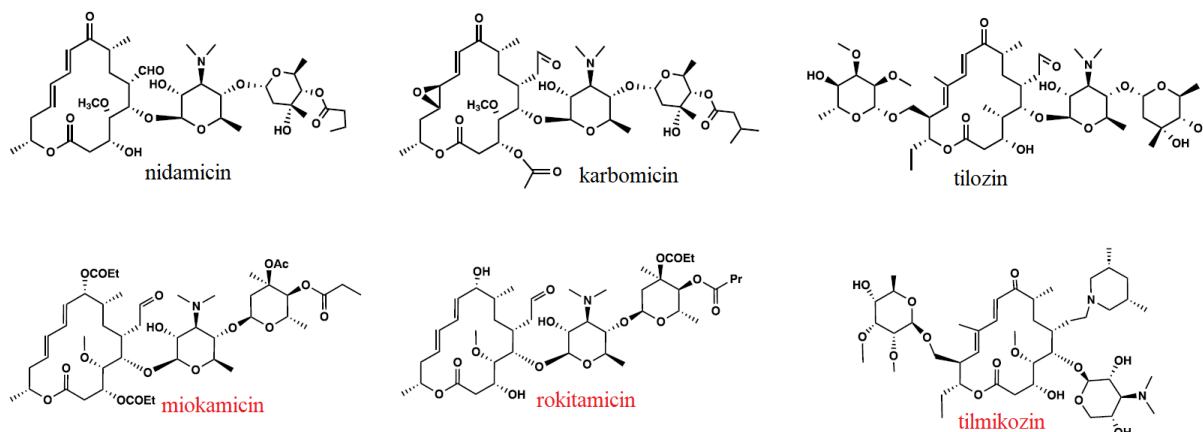


Slika 5. Shematski prikaz sinteze i strukturna formula azitromicina. Preuzeto i prilagođeno iz D. Jelić, *et al.*, *Antibiotics*, **5** (2016) 3.

2.1.3. 16-erolančani makrolidni antibiotici

Makrolidi sa 16-eročlanim laktonskim prstenom predstavljaju također značajnu skupinu antibiotika, ali su ih zasjenili 14-erolančani makrolidi. Od prirodnih 16-eročlanih makrolida u kliničkoj upotrebi su tilozin, karbomicin i nidamicin, te od polusintetskih miokamicin i rokitamicin, koji su razvijeni za ljudsku upotrebu i tilmikozin razvijen isključivo za veterinarsku upotrebu. Strukture ovih makrolida prikazane su na slici 6. Kemijske i biokemijske modifikacije 16-eročlanih makrolida bile su manje uspješne, jer samo mala količina sintetiziranih molekula ima poboljšanu bioraspoloživost i aktivnost protiv nekih rezistentnih

mikroorganizama. 16-eročlani makrolidi ipak pokazuju neke prednosti nad 14-eročlanim makrolidima na bazi eritromicina, uključujući manje interakcija lijek-lijek, bolju gastrointestinalnu toleranciju te djelovanje protiv nekih rezistentnih bakterija zbog produljenog dometa 16-eročlanih makrolida u izlazni tunel peptida, što omogućuje stvaranje dodatnih interakcija između ribosoma i makrolida.

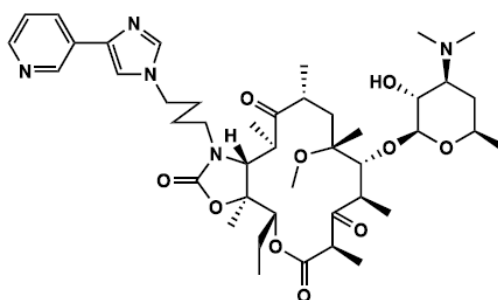


Slika 6. Strukturne formule prirodnih (crno) i polusintetskih (crveno) 16-eročlanih makrolida.

Preuzeto i prilagođeno iz G. P. Dinos, *Br. J. Pharmacol.*, **174** (2017) 2968,2970.

2.1.4. Ketolidi

Zbog sve veće bakterijske otpornosti na makrolidne antibiotike, daljnja istraživanja usmjerena su na razvoj sljedeće generacije makrolida s ciljem djelovanja protiv otpornih vrsta. Tako je razvijena treća generacija makrolida – ketolidi. U ketolidima je molekula šećera kladinoze na C-3 atomu laktonskog prstena eritromicina A zamijenjena karbonilnom skupinom. Osim toga, gotovo svi ketolidi sadrže povezani 11,12-ciklički karbamat i alkil-arilni bočni lanac vezan na različitim položajima laktonskog prstena. Ostale modifikacije uključuju još fluoriranje na položajima C-2 i/ili C-12, modificirane 5-O-dezozamin ketolide, zamjenu dezozamina drugim molekulama šećera. Jedini ketolid na današnjem tržištu je telitromicin, čija je struktura prikazana na slici 7, dok se solitromicin još uvijek nalazi u kliničkim ispitivanjima faze III i čini se da je najperspektivniji ketolid.



Slika 7. Strukturna formula telitromicina. Preuzeto i prilagođeno iz G. P. Dinos, *Br. J. Pharmacol.*, **174** (2017) 2970.

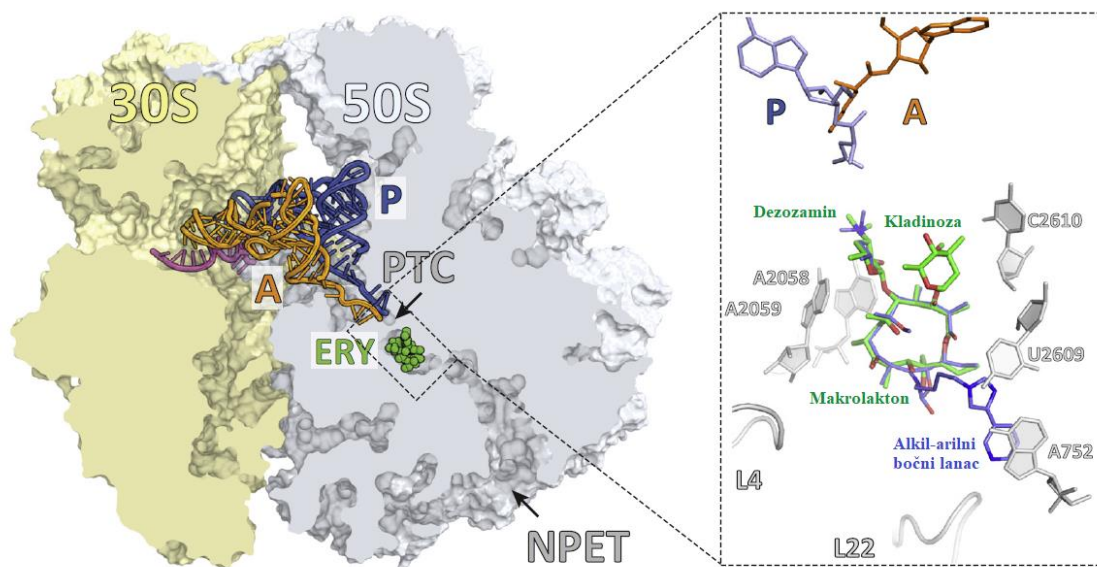
2.2. Mehanizam djelovanja

Makrolidni antibiotici djeluju inhibitorno na sintezu proteina i rast stanica u bakterijama, ali ne u stanicama arheja i eukariota. Selektivnost je povezana sa stvaranjem interakcija između molekula makrolida i nukleotidnog ostatka adenoзина 2058 (A2058). Ovaj adenzin je očuvan u bakterijskim stanicama, dok kod arheja i eukariota taj položaj zauzima gvanozin, pa je vezanje makrolida na ribosome tih stanica neznatno.³

2.2.1. Vezno mjesto za makrolide

Makrolidni antibiotici inhibiraju sintezu proteina vezanjem na podjedinicu 50S bakterijskog ribosoma unutar tunela kojim izlazi nastali peptid (NPET), a koji se nalazi u blizini peptidil-transferaznog centra (PTC), koje je katalitičko mjesto za stvaranje peptidne veze. Vezno mjesto makrolida u ribosomu se primarno sastoji od dušičnih baza molekule 23S rRNA. Prilikom vezanja molekule makrolida stvaraju se brojne hidrofobne interakcije i vodikove veze između funkcionalnih skupina laktonskog prstena i dušičnih baza u 23S rRNA, a u slučaju nekih makrolida sa 16-eročlanim laktonskim prstenom javljaju se i kovalentne interakcije. Od velikog značaja su interakcije koje se stvaraju između molekule rRNA i šećera vezanog na C-5 atomu laktonskog prstena, koji može biti mono- ili disaharid. Tako dezozamin u eritromicinu, ali i ostalim makrolidima s 14-eročlanim laktonskim prstenom, vezanjem na bakterijski ribosom stvara vodikove veze sa dušičnim bazama A2058 i A2059. Važnost interakcija sa ova dva nukleotida objašnjava pojavu rezistencije uslijed njihove mutacije ili dimetilacije, o čemu će biti riječi kasnije. Također, neki od makrolida interagiraju sa ribosomskim proteinima L4 i L22,

što također objašnjava pojavu rezistencije uslijed mutacija u genima koji kodiraju te proteine. Makrolaktonski prsten različitih makrolida leži ravno uz zid tunela, dok molekule šećera vezane na položajima C-3 i C-5 strše prema peptidil-transferaznom centru, ali ne dosežu njegovo aktivno mjesto.⁴

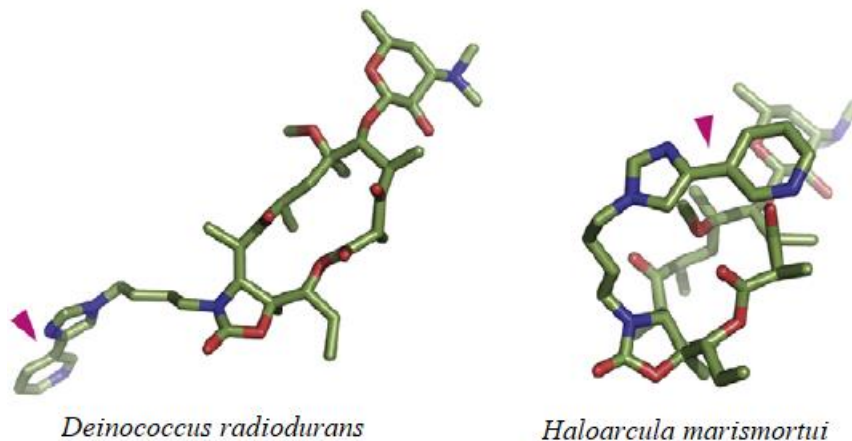


Slika 8. Vezno mjesto makrolida u bakterijskom ribosomu. Makrolidi se vežu u tunel u blizini peptidil-transferaznog centra. Ovdje je prikazano vezanje eritromicina (zeleno) i telitromicina (plavo). Prikazan je i segment vezane mRNA (ljubičasto obojen). Preuzeto i prilagođeno iz N.

Vázquez-Laslop, *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, **43** (2018) 672.

Struktura ribosoma među bakterijskim vrstama je evolucijski očuvana, a to se također odnosi i na mnoge dijelove rRNA molekula koje se nalaze u važnim funkcionalnim središtima ribosoma, među kojima je i vezno mjesto makrolidnih antibiotika. Zbog toga se često pretpostavlja da je vezanje makrolida, ali i ostalih lijekova na ribosome različitih bakterijskih vrsta identično ili vrlo slično. Samo mjesto vezanja makrolida je očuvano među ribosomima izoliranim iz različitih vrsta bakterija, ali se ne ostvaruju uvijek identične interakcije između antibiotika i ribosoma. Svi makrolidi ostvaruju interakcije sa dva nukleotidna ostatka (A2058 i A2059), međutim vezanjem na primjer ketolida, ovisno o vrsti iz koje je izoliran ribosom, može doći do stvaranja interakcije između bočnog alkil-arilnog lanca i adenina označenim sa 752 (slika 8), pri čemu se bočni lanac ketolida proteže u tunel kojim izlazi nastali peptid. Tako telitromicin stvara interakcije s A752 u ribosomima izoliranim iz bakterija *Escherichia coli* i

Staphylococcus aureus, dok ta interakcija nije opažena kod vezanja telitromicina na ribosome izolirane iz bakterija *Deinococcus radiodurans* i *Haloarcula marismortui*, zbog drugačije orijentacije alkil-arilnog bočnog lanca.



Slika 9. Orijentacija alkil-arilnog bočnog lanca telitromicina, vezanog na ribosom bakterija *D. radiodurans* (lijevo) i *H. marismortui* (desno). Preuzeto i prilagođeno iz A. S. Mankin, *Curr. Opin. Microbiol.*, **11** (2008), 417.

2.2.2. Inhibicija sinteze proteina

Precizan mehanizam djelovanja makrolida ovisi o njihovoj specifičnoj kemijskoj strukturi, koja utječe na interakcije između makrolida i ribosoma. Makrolidima se mogu pripisati četiri načina inhibicije sinteze proteina u bakterijskim stanicama:

1. Inhibicija napredovanja stvaranja peptidnog lanca u ranoj fazi translacije
2. Potpomognuta disocijacija peptidil-tRNA sa ribosoma
3. Inhibicija stvaranja peptidne veze
4. Interferencija sa podjedinicom 50S

Glavni mehanizam inhibicije sinteze proteina pomoću makrolida povezan je s njihovim vezanjem u izlaznom peptidnom tunelu, koji se prvenstveno sastoji od 23S rRNA. Tunel je relativno širok, oko 15 Å, ali sadrži suženje koje je širine oko 10 Å, a sačinjeno je od proteina L4 i L22 u blizini peptidil-transferaznog centra. Makrolidi se vežu upravo u blizini tog suženja i blokiraju put za rastući polipeptidni lanac. Prilikom vezanja 14- i 15-eročanih laktonskih prstenova makrolida, sinteza proteina u početku je neometana sve dok nastali peptid ne postane dovoljno velik i ne dosegne vezani makrolid u blizini suženja kanala, nakon čega dolazi do

inhibicije stvaranja peptidne veze. Na poslijetku inhibicija izgradnje proteina dovodi do otpuštanja peptidil-tRNA sa ribosoma.

Važno pitanje je zatvaraju li molekule makrolida izlazni tunel peptida u potpunosti, čime se sprječava prolaz nastalog peptida, ili je to samo prepreka koja sužava tunel i ostavlja dovoljno prostora za prolazak nastalog peptida. U početku je prevladavalo mišljenje da makrolidi tvore neprohodnu barijeru u izlaznom tunelu za peptide, jer su homopolimerni peptidi, sintetizirani u prisutstvu makrolida, bili vrlo kratki, dužine dvije do pet aminokiselina.⁵ Također, prve kristalografske strukture ribosoma sa vezanim makrolidom pokazivale su da je otvor tunela bio preuzak za prolazak nastalog peptida. Kako je vezno mjesto makrolida udaljeno samo oko 10 Å od peptidil-transferaznog centra, dovoljna je duljina peptida od 3-4 aminokiselinska ostatka da bi peptid dosegao vezani makrolid. Međutim, istraživanja su pokazala da je molekula peptidil-tRNA, koja je disocirala sa ribosoma na kojem je vezan eritromicin, nosila peptidni lanac sa 6 do 8 aminokiselina, dok su u slučaju vezanog telitromicina, ribosomi mogli sintetizirati čak i dulje peptide, sa 9 do 10 aminokiselinskih ostataka.⁶ Izlazni tunel peptida je dinamičke strukture. Promjena orijentacije nekih nukleotidnih ostataka uslijed vezanja makrolida ili specifična sekvenca nastalog peptida mogu promijeniti volumen i geometriju izlaznog tunela. Jedan od nukleotidnih ostataka u rRNA koji može promijeniti svoju orijentaciju je A2062. U odsutnosti antibiotika, A2062 leži ravno uz zid tunela, dok vezanje makrolida sa 16-eročlanim laktonskim prstenom uzrokuje njegovu rotaciju u središte tunela pri čemu se otvor tunela zatvara. Makrolidi sa 14- i 15-eročlanim prstenovima ne uzrokuju rotaciju A2062. Na geometriju tunela i sposobnost stvaranja peptidne veze također utječu i ribosomski proteini L4 i L22, koji tvore suženje u tunelu. Iako ne zatvaraju tunel u potpunosti, makrolidi svakako ometaju sintezu proteina. Nastajući peptid može dostići veličinu čak i dulju od udaljenosti od veznog mjesta makrolida, ali će njegova sinteza biti neizbježno prekinuta zbog disocijacije peptidil-tRNA sa ribosoma prije nego što peptid dosegne odgovarajuću veličinu.

Sinteza proteina nije u potpunosti inhibirana djelovanjem makrolidnih antibiotika, već oni inhibiraju sintezu nekoliko specifičnih proteina. Specifični kratki peptidi mogu pomoću svog N-kraja izbaciti molekulu makrolida iz svog veznog mjesta u tunelu, pri čemu se izbačeni makrolid ne može ponovno vezati sve dok sinteza tog proteina ne završi, jer ne može ući u tunel. Iz ovoga slijedi da su proteini, koji su otporni na makrolide, sintetizirani u ribosomu za koji nije vezan antibiotik. Međutim, biokemijski dokazi tvrde da se sinteza tih otpornih proteina odvija na ribosomima sa vezanim makrolidnim antibioticima.⁷

2.3. Mehanizmi bakterijske rezistencije na makrolide

Česta upotreba makrolidnih antibiotika dovela je do širenja rezistentnih vrsta. Prvi slučaj otpornosti je primijećen kod eritromicina samo nekoliko godina nakon njegova uvođenja u kliničku primjenu. Rezistencija nije ograničena na samo jedan mehanizam, već ih je uočeno nekoliko. Mehanizmi rezistencije mogu biti usmjereni na zaštitu i modifikaciju veznog mjesta makrolida u ribosomu, kao što je promjena 23S rRNA ili mutacija ribosomskih proteina L4 i L22, zatim na smanjenje unutarstanične koncentracije makrolida te kemijske modifikacije antibiotika.

2.3.1. Smanjenje unutarstanične koncentracije makrolida

Unutarstanična koncentracija makrolida može se smanjiti korištenjem transportera koji aktivno izbacuju antibiotike iz stanice (tzv. efluksne pumpe). Otkriveno je nekoliko različitih superobitelji pumpi koje sudjeluju u stvaranju bakterijske rezistencije na antibiotike, uključujući MFS (major facilitators superfamily), ABC (ATP-binding cassette), MATE (multidrug and toxic compound extrusion), RND (resistance-nodulation-division) i SMR (small multidrug resistance). Od osobite važnosti za makrolidne antibiotike su Mef i Msr obitelj pumpi, koje su kodirane plazmidima i članovi su MFS i ABC superobitelji.

Mef pumpe, članovi MFS superobitelji, sastoje se od 12 transmembranskih domena povezanih hidrofilnim petljama. Ne koriste izravno ATP kao izvor energije za aktivnost, već koriste sekundarni aktivni transport u kojem se prijenos jedne tvari usprkos gradijentu odvija uz prijenos druge tvari u smjeru gradijenta. Stoga, Mef pumpe djeluju kao antiporter, odnosno izbacuju molekulu makrolida u zamjenu za proton. Geni za Mef transportere uglavnom se nalaze u Gram-pozitivnim bakterijama, ali su primijećeni i u nekim Gram-negativnim bakterijskim vrstama. Postoje dva glavna podrazreda ovih pumpi – Mef(A) i Mef(E). Oboje daju otpornost na 14- i 15-eročlane, ali ne i na 16-eročlane makrolide. Mef geni su regulirani atenuacijom transkripcije.⁸ Msr pumpe su članovi ABC obitelji koja koristi ATP kao izvor energije za aktivni prijenos. Postoje četiri klase Msr proteina, to su tipovi A, C, D i E, pri čemu svaki tip ima ATP-veznu domenu. Obitelj ovih pumpi daje otpornost na 14- i 15-eročlane makrolide te nisku razinu otpornosti na ketolide.

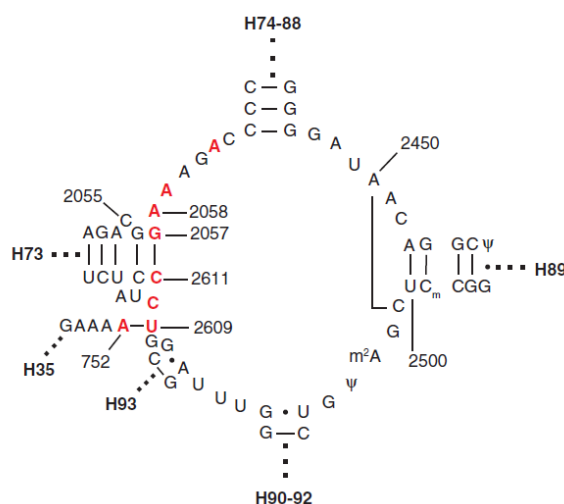
2.3.2. Modifikacije na ribosomu

Modifikacije na ribosomu odgovorne za pojavu rezistencije su one koje se zbivaju u veznom mjestu makrolida. To uključuje post-translacijsku doradu kao i mutacije 23S rRNA te mutacije ribosomskih proteina L4 i L22. Makrolidi za svoje djelovanje koriste isti dio ribosoma kao i nekoliko drugih antibiotika, posebno linkozamida i streptogramina B. Stoga, jedna od modifikacija na ribosomu u bakterijama otpornim na makrolide, može dati otpornost na linkozamid i streptogramin B. Ovaj fenotip se naziva MLS_B (makrolid-linkozamid-streptogramin B) otpornost.

Najčešći mehanizam modifikacije veznog mjesta makrolida je metilacija nukleotidnog ostatka A2058 na 23S rRNA pomoću Erm metil-transferaza (Erm dolazi od eng. erythromycin resistance methylase). Erm metil-transferaze (Erm MT-aze) kataliziraju prijenos jedne ili dvije metilne skupine sa S-adenozil-metionina na dušikov N-6 atom adenoza 2058. Afinitet vezanja makrolida na ribosom je nakon metilacije A2058 drastično smanjen zbog steričkih smetnji, jer metilacija ometa stvaranje produktivne vodikove veze između molekule šećera vezanog za C-5 atom laktonskog prstena i nukleotida A2058. Monometilacija daje relativno nisku otpornost, dok dimetilacija daje visoku otpornost na makrolide. Nukleotidni ostatak A2058 je također uključen u vezanje linkozamida i streptogramina B, pa njegova dimetilacija uzrokuje otpornost na sve MLS_B antibiotike, te na ketolid telitromicin. Potpuno sastavljeni ribosom nije supstrat Erm metil-transferaza, zato jer se tada A2058 nalazi duboko u središtu velike podjedinice ribosoma, stoga se metilacija zbiva samo prilikom sklapanja (biogeneze) ribosoma. Ekspresija gena koji kodiraju Erm enzime može biti inducibilna ili konstitutivna. U slučaju inducibilnog fenotipa do ekspresije Erm MT-aze dolazi u prisutnosti antibiotika i najčešće je regulirana atenuacijom translacije. Eritromicin i ostali makrolidi koji sadrže C-3 vezanu kladinozu za laktonski prsten, učinkovito induciraju ekspresiju Erm gena, te uzrokuju MLS_B otpornost. Ketolidi, koji umjesto molekule kladinoze na C-3 atomu laktonskog prstena sadrže karbonilnu skupinu, slabi su induktori Erm gena i aktivni su protiv nekih monometiliranih rRNA. Kod konstitutivne ekspresije Erm gena nije potrebna prisutnost makrolida, već je posttranslacijska metilacija nukleotida dio sazrijevanja svih molekula RNA, uključujući i 23S rRNA u bakterijskim stanicama. Ovaj tip ekspresije Erm gena osigurava stalnu zaštitu od djelovanja antibiotika na bakterije i važna je za one bakterije koje sintetiziraju makrolide. Do danas je

izolirano i identificirano više od 60 Erm proteina iz mnogih različitih vrsta bakterija, što rezultira jednostavnim i učinkovitim širanjem bakterijske otpornosti na antibiotike.

Osim navedenih metilacija, mutacije 23S rRNA također dovode do otpornosti bakterijskih vrsta na makrolidne antibiotike. Tako mutacije A2058 mijenjaju vezno mjesto makrolida i sprječavaju njihovo vezanje, kao i vezanje linkozamida i streptogramina B, dok mutacije na A2059 daju otpornost na makrolide i linkozamide.



Slika 10. Sekundarna struktura 3'-regije 23S rRNA. Nukleotidi prikazani crvenom bojom naznačuju mutacije koje mogu dovesti do otpornosti na 14-, 15- i 16-eročlane makrolide i ketolide. Preuzeto i prilagođeno iz C. Fyfe, *et al.*, *Cold Spring Harbor Perspect. Med.*, **6** (2016) 7.

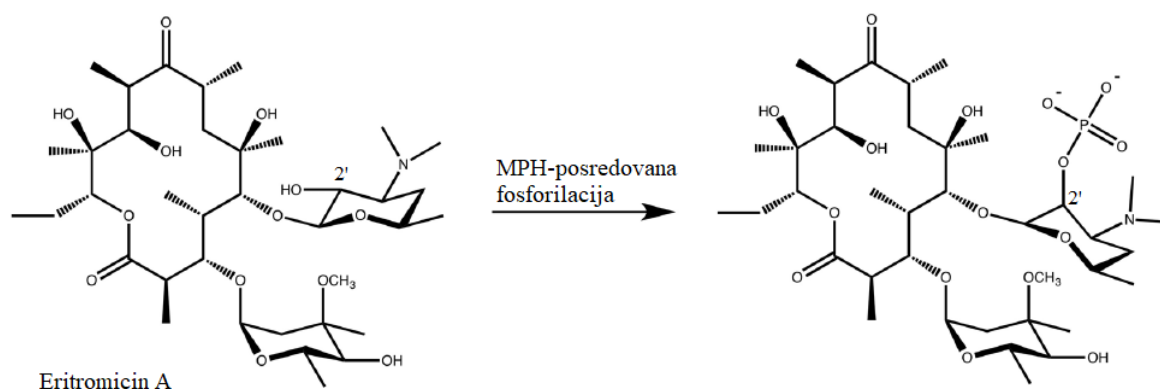
Mutacije u nekim ribosomskim proteinima također daju otpornost na makrolide. Takve su promjene primijećene na proteinima L4 i L22, a podrazumijevaju promjenu pojedinačnih aminokiselina ili umetanja, odnosno brisanja jedne ili više aminokiselina tih proteina. Otpornost bakterija na makrolidne antibiotike se dodatno povećava kada su metilacije ili mutacije na 23S rRNA kombinirane s mutacijama na ribosomskim proteinima.

2.3.3. Kemijske modifikacije makrolida

Enzimski katalizirane modifikacije makrolidnih antibiotika za posljedicu imaju gubitak antibiotskog djelovanja, jer takvi makrolidi nisu sposobni učinkovito se vezati na 50S podjedinicu bakterijskog ribosoma. Poznate su dvije klase enzima u bakterijama odgovornih za

modifikacije na makrolidima, a to su makrolidne fosfotransferaze (MPHs) i makrolidne esteraze (Eres). Identificirana je i treća klasa enzima koji modificiraju makrolide, makrolidne glikozil-transferaze, međutim ti enzimi ne sudjeluju u stvaranju rezistencije na antibiotike jer su prisutni samo u mikroorganizmima koji proizvode makrolide, te omogućuju tim stanicama preživljavanje.

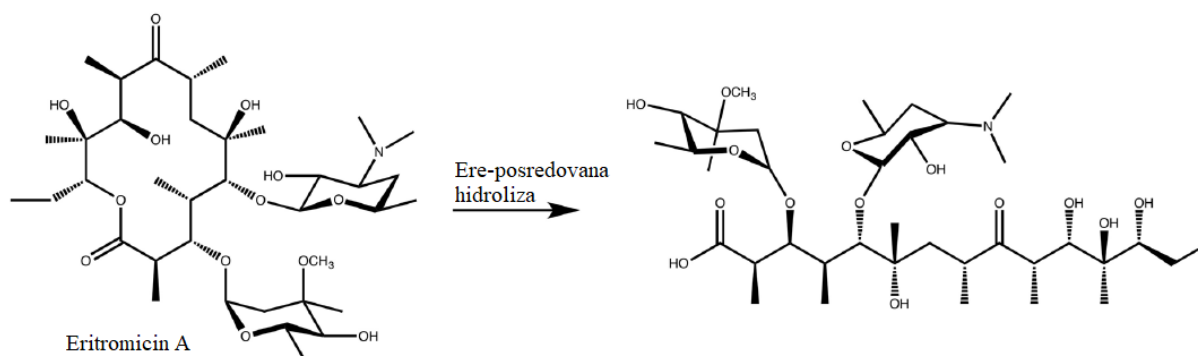
Makrolidne fosfotransferaze kataliziraju reakcije fosforilacije makrolidnih antibiotika, a prisutne su u Gram-negativnim i Gram-pozitivnim bakterijama. Prva izolirana i identificirana bila je makrolidna 2'-fosfotransferaza koja je katalizirala reakciju fosforilacije 2'-hidroksilne skupine dezozamina vezanog za eritromicin i oleandomicin. Općenito, u reakciji kataliziranoj makrolidnom fosfotransferazom dolazi do prijenosa γ -fosfatne skupine nukleotidnog trifosfata na 2'-OH skupine dezozamina 14-, 15- ili 16-eročlanog makrolida, čime dolazi do narušavanja ključne interakcije između makrolida i nukleotida A2058. Iako su rana istraživanja pokazivala kako bi donor fosforilne skupine mogao biti ATP, novija saznanja pokazuju veću sklonost prema GTP kao donoru fosforilne skupine.



Slika 11. Fosforilacija 2'-OH skupine dezozamina vezanog za eritromicin, katalizirana makrolidnom fosfotransferazom. Preuzeto i prilagođeno iz T. Golkar, *et al.*, *Front. Microbiol.*, **9** (2018) 1942.

Tijekom biosinteze makrolida dolazi do nastajanja esterske veze prilikom stvaranja cikličkog laktona u reakciji kataliziranoj poliketidnom sintazom. Makrolidne esteraze hidroliziraju ovu vezu pri čemu lineariziraju makrolid, koji se tada više ne može vezati na ribosom. Hidrolitička inaktivacija makrolida pomoću esteraza specifično uključuje 14- i 15-eročlane makrolide, dok

16-eročlani poput josamicina, midekamicina i spiramicina nisu supstrati ovih enzima. Također, makrolidne esteraze ne uzrokuju MLS_B otpornost, već samo otpornost na makrolide.



Slika 12. Hidroliza eritromicina A posredovana eritromicin esterazom. Preuzeto i prilagođeno iz T. Golkar, *et al.*, *Front. Microbiol.*, **9** (2018) 1942.

Trodimenzionalne strukturne informacije o različitim mehanizmima pomoću kojih bakterije postaju otporne na makrolide, mogu se iskoristiti za razvoj novih generacija makrolida koji bi djelovali na otporne sojeve bakterija. Također, dosadašnje informacije o načinu djelovanja makrolida kao i njihovoj interakciji s ribosomima doprinose tom razvoju. Cilj je razviti nove generacije makrolida koje bi mogle ili prevladati ili spriječiti otpornost na te antibiotike. Jedan od načina borbe sa rezistencijom na makrolide je razvijanje inhibitora biosinteze proteina za otporne vrste, koji se zatim mogu iskoristiti kao pomoćna sredstva za obnovu aktivnosti već postojećih antibiotika. Razvoj novih generacija je olakšan napretkom u sintezi raznih varijanata makrolida bilo pomoću proteinskog inženjerstva poliketidnih sintaza, bilo pomoću sinteze *de novo*.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. S. Arenz, D. N. Wilson, *Cold Spring Harbor Perspect. Med.*, **6** (2016)
2. D. Jelić, R. Antolović, *Antibiotics*, **5** (2016) 29
3. A. S. Mankin, *Curr. Opin. Microbiol.*, **11** (2008), 414-421
4. N. Vázquez-Laslop, A. S. Mankin, *Trends Biochem. Sci.*, **43** (2018) 668-684
5. M. Gaynor, A.S. Mankin, *Front. Med. Chem.*, **2** (2005) 21-35
6. T. Tenson, M. Lovmar, M. Ehrenberg, *J. Mol. Biol.* **330** (2003) 1005–1014
7. K. Kannan, N. Vázquez-Laslop, A. S. Mankin, *Cell*, **151** (2012) 508-520
8. C. Fyfe, T. H. Grossman, K. Kerstein, J. Sutcliffe, *Cold Spring Harbor Perspect. Med.*, **6** (2016)
9. <https://pdb101.rcsb.org/motm/10> (datum pristupa 10. srpnja 2019.)
10. T. Golkar, M. Zieliński, A. M. Berghuis, *Front. Microbiol.*, **9** (2018) 1942
11. G. P. Dinos, *Br. J. Pharmacol.*, **174** (2017) 2967-2983.